

Caracterización de resistencia de *Spodoptera frugiperda* a maíz Cry1F en Puerto Rico*

Ana María Vélez¹, Terence A. Spencer², Analiza P. Alves³, Dan Moellenbeck⁴, Robert L. Meagher⁵, Haridas Chirakkal⁶ y Blair D. Siegfried²

¹ Entomóloga, Ph.D. Postdoctoral-Associate, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, USA. anamaria.velez@gmail.com. ² University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, USA. ³ Dupont Pioneer, Johnston, IA. ⁴ DM Crop Research Group Inc. Polk City, IA. ⁵ USDA-ARS CMAVE, Gainesville, FL. ⁶ Department of Biological Sciences, University of Nebraska, Lincoln

* En caso de querer citar este trabajo, por favor hacer referencia a la publicación original: ¹Ana Maria Velez, ¹Terence A. Spencer, ²Analiza P. Alves, ³Dan Moellenbeck, ⁴Robert L. Meagher, ⁵Haridas Chirakkal and ¹Blair D. Siegfried. 2013. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Bulletin of Entomological Research. In press.

Resumen. Desde 2003 se ha registrado el uso de maíz transgénico Cry1F para el control de *Spodoptera frugiperda* desde 2003 en Estados Unidos y Puerto Rico. En el 2006 se reportaron daños inesperados en maíz Cry1F en Puerto Rico generados por *S. frugiperda* resistente a Cry1F. La herencia de resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* fue caracterizada usando una colonia resistente proveniente de Puerto Rico, la cual exhibió una resistencia 387 veces mayor que una colonia susceptible. Se realizaron bioensayos con un rango de concentraciones en la descendencia de los cruces recíprocos de las colonias parentales susceptible y resistente. Los resultados de estos bioensayos indicaron que la resistencia a Cry1F es recesiva y autosomal. Bioensayos del retrocruce de la F₁ con los parentales resistentes indicaron que la resistencia es monogénica. Adicionalmente, se evaluó la resistencia cruzada de Cry1F con Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry2Aa y Vip3Aa fue evaluada. Para Cry1Aa, Cry1Ba y Cry2Aa no se observó evidencia de resistencia cruzada con Cry1F, aunque se encontraron efectos limitados para la colonia susceptible. Vip3Aa fue efectiva contra la colonia susceptible y resistente, indicando que no existe resistencia cruzada entre Vip3Aa y Cry1F. En contraste, se observó resistencia cruzada con Cry1Ab y Cry1Ac. Para detectar el riesgo de resistencia a Cry1F en Florida y Texas se midió la frecuencia de alelos resistentes durante los años 2010 y 2011 usando un análisis de la F₁. Se observó una frecuencia de 0.13 y 0.02 para Florida y Texas respectivamente, indicando que alelos resistentes pueden encontrarse en poblaciones de Estados Unidos.

Palabras clave: Gusano cogollero del maíz, maíz Bt, Cry1F, resistencia, manejo de resistencia.

Abstract. Cry1F transgenic corn Cry1F has been registered for *Spodoptera frugiperda* control since 2003. Unexpected damage to Cry1F corn was reported in 2006 in Puerto Rico and resistance in *S. frugiperda* was documented. The inheritance of Cry1F resistance was

characterized in a *S. frugiperda* resistant strain from Puerto Rico which displayed >387-fold resistance to purified Cry1F. Concentration-response bioassays of reciprocal crosses of resistant and susceptible parental populations indicated that resistance is recessive and autosomal. Bioassays of the backcross of the F₁ generation crossed with the resistant parental strain suggest that a single locus is responsible for resistance. In addition, cross-resistance to Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry2Aa and Vip3Aa was assessed in the Cry1F resistant strain. There was no significant cross-resistance to Cry1Aa, Cry1Ba and Cry2Aa, although only limited effects were observed in the susceptible strain. Vip3Aa was highly effective against susceptible and resistant insects indicating no cross-resistance with Cry1F. In contrast, cross-resistance was observed for both Cry1Ab and Cry1Ac. To identify the risk of resistance in Florida and Texas, and F₁ screening was performed to calculate the frequency of resistant alleles during 2010 and 2011. Because the resistance is recessive and conferred by a single locus, an F₁ screen was performed to measure the frequency of resistant alleles in 2010 and 2011. A total frequency of 0.13 and 0.02 was found for Florida and Texas population respectively, indicating resistant alleles could be found in U.S. populations.

Keywords: Fall armyworm, *Bt* corn, Cry1F, resistance, resistance management.

Introducción

Los cultivos transgénicos que expresan toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) han sido ampliamente usados desde 1996 para controlar insectos plaga (Shelton *et al.* 2002; James 2009), sin embargo, la exposición prolongada a toxinas *Bt* puede generar resistencia, reduciendo la utilidad a largo plazo de esta tecnología. El desarrollo de programas efectivos para el manejo de resistencia depende del entendimiento de la evolución de resistencia (United States Environmental Protection Agency 2001).

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), es un insecto endémico del hemisferio occidental distribuido desde Argentina hasta Norte América (Sparks 1979). Este insecto es una plaga importante de maíz y algodón en el neotrópico y de fin de temporada en Estados Unidos (Mitchell *et al.* 1991). *S. frugiperda* no posee diapausa y es vulnerable a temperaturas de congelación, por esa razón, en Norte América, cada año ocurren migraciones temporales desde el sur de la Florida y Texas hacia regiones mas templadas (Nagoshi *et al.* 2010; Nagoshi *et al.* 2012). Estudios de genética de poblaciones sugieren que las poblaciones de *S. frugiperda* de Puerto Rico son más similares a las poblaciones de la Florida comparada con las poblaciones de Brasil o Texas y adicionalmente se ha propuesto que existe intercambio genético limitado entre las poblaciones de Texas y Florida (Nagoshi *et al.* 2010; Nagoshi *et al.* 2012).

Una de las estrategias más recientes para manejar poblaciones del gusano cogollero del maíz es el uso de maíz *Bt* transgénico expresando la toxina Cry1F el cual proporciona un mejor

control que los híbridos que expresan Cry1Ab (Siebert *et al.* 2008). Los híbridos que expresan Cry1F han estado disponibles comercialmente desde 2003 y comercializados como Herculex I® *Insect Protection* (evento de transformación TC1507). En Puerto Rico el maíz Cry1F ha sido plantado desde 1998 para el desarrollo de híbridos y la producción de semillas (Buntin 2008). En el 2006 se reportaron daños inesperados en maíz Cry1F en Puerto Rico generados por *S. frugiperda* resistente a Cry1F (Matten *et al.* 2008; Tabashnik *et al.* 2009; Storer *et al.* 2010). La resistencia en campo de *S. frugiperda* a Cry1F en Puerto Rico, representa uno de los siete casos documentados de resistencia a un cultivo transgénico *Bt* en el campo, y el primer caso que ha llevado a retirar un cultivo *Bt* del mercado (Tabashnik *et al.* 2009).

Se cree que varios factores han contribuido a la evolución de resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* en Puerto Rico. En primer lugar, Puerto Rico es un ecosistema aislado y subdividido por terrenos montañosos. Este tipo de topografía restringe la migración del insecto generando una selección intensa de poblaciones locales. De igual forma, el clima tropical de Puerto Rico permite el establecimiento del cultivo de maíz durante todo el año con múltiples generaciones de *S. frugiperda* expuestas a presión de selección por parte del maíz transgénico. La larga historia de uso de insecticidas *Bt* para manejo de *S. frugiperda* en vegetales y maíz, junto con el uso de otros eventos *Bt* expresando Cry1Ab también pudieron contribuir con la presión de selección. Finalmente, en el 2006 tras una severa sequía en Puerto Rico, las poblaciones de *S. frugiperda* se vieron forzadas a concentrarse en cultivos irrigados, de los cuales el maíz Cry1F era un importante componente. La presión de selección generada en 2006 ha sido la más intensa observada hasta la fecha (Storer *et al.* 2011, 2012).

La caracterización de resistencia en insectos que han evolucionado resistencia a cultivos *Bt* en el campo es importante para generar mejores estrategias de manejo de resistencia de las generaciones actuales y futuras de cultivos transgénicos (Tabashnik *et al.* 2009). Para comprender la resistencia en un contexto evolutivo y ecológico es importante estudiar la base genética de la resistencia y el efecto de alelos resistentes en el *fitness*. El estudio de estos parámetros poblacionales contribuyen a la interpretación de tasas de cambio de frecuencias de alelos resistentes en poblaciones naturales y pueden ser usadas en programas para retrasar la evolución de resistencia (McKenzie 1996). En este estudio, se investigaron los patrones de herencia a Cry1F (dominancia, ligamiento al sexo y número de locus) y la resistencia cruzada a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry2Aa y Vip3Aa. La caracterización de la herencia permitió el uso de un análisis de la F_1 para detectar la frecuencia de alelos resistentes en poblaciones fuera de Puerto Rico (Florida y Texas). Los resultados de esta investigación tienen implicaciones directas para el manejo de la resistencia de *S. frugiperda* en maíz Cry1F.

Materiales y métodos

Colonias y Cría de Insectos. La colonia resistente de *S. frugiperda* fue recolectada en Puerto Rico y seleccionada usando tejido vegetal de maíz Cry1F, mientras que la colonia susceptible se obtuvo

de las crías comerciales de BioServ. Las dos colonias fueron mantenidas usando técnicas de cría adaptadas de Perkins (1979). Cada generación fue perpetuada usando al menos 200 individuos con apareamiento al azar. Las larvas se criaron en dieta general para Lepidoptera (BioServ, Frenchtown, NJ) y los adultos en una solución de cerveza con ácido ascórbico, ácido propiónico, aureomicina y vitaminas (Perkins 1979).

Toxinas Bt. Dupont Pioneer proporcionó la toxina Cry1F usada para los bioensayos, la proteína fue expresada en células BtG8 y purificada usando métodos analíticos estandarizados. Las proteínas Cry usadas para los experimentos de resistencia cruzada fueron purificadas de la fermentación de cepas recombinantes de *Escherichia coli* (Migula) transformadas para expresar Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba y Cry2Aa. La toxina Vip3Aa fue proporcionada por Syngenta Biotechnology.

Bioensayos. Los bioensayos se realizaron usando los métodos descritos por Marçon *et al.* (1999) en bandejas con 128 pozos. En cada pozo se dispensó 1 ml de dieta general para Lepidoptera, permitiendo el secado previo a la introducción de la toxina. Siete concentraciones se usaron para determinar la concentración letal CL₅₀. Las diluciones se hicieron en una solución al 0.1% de Triton-X 100 para obtener una distribución uniforme en la superficie. Cada pozo fue tratado con 30 µl de la concentración apropiada, mientras que el control negativo fue tratado con 30 µl de 0.1% Triton-X 100. Los pozos tratados se dejaron secar. Posteriormente una larva con menos de 24 horas de emergencia fue transferida a cada pozo usando un pincel fino. Los pozos se cubrieron y se mantuvieron en una incubadora a 27°C, con 24 horas de oscuridad y una humedad relativa de 80%. Después de 7 días de exposición a la toxina la mortalidad y el peso total de las larvas por dosis fueron registrados. Las larvas que no crecieron por encima del primer instar y con pesos ≤ 0.1 mg fueron consideradas muertas. Por lo tanto, la mortalidad en este estudio incluyó la inhibición del crecimiento y la muerte de las larvas. La mortalidad del control fue del 6% en promedio y replicas con mortalidad mayor a 20% no fueron incluidas.

Los datos de mortalidad por concentración fueron analizados por medio de un análisis *probit* (Finney, 1971) usando POLO-PC (LeOra Software 1987). Se calcularon la CL₅₀ y CL₉₉ y los intervalos de confianza al 95%, la pendiente y el error estándar. Una prueba de máxima similitud se realizó para determinar si los CL₅₀ eran iguales. La concentración diagnóstico se determinó basándose en el límite superior del intervalo de confianza de la CL₉₉ de la colonia susceptible. La tasa de sensibilidad a Cry1F fue determinada usando los valores de la CL₅₀ de la colonia susceptible dividido por la CL₅₀ de la colonia resistente (Robertson *et al.* 1995, 2007). Cuando no se generó mortalidad en los bioensayos debido a la resistencia, la concentración más alta se usó para calcular la tasa de sensibilidad. Los coeficientes de sensibilidad se consideraron iguales si los intervalos de confianza no se superpusieron.

Experimentos de Herencia. Para evaluar la ligación al sexo y la dominancia de resistencia, se realizaron bioensayos con la progenie de la F₁ de los cruces recíprocos entre la colonia resistente y

la susceptible (susceptible ♀ x resistente ♂ y susceptible ♂ x resistente ♀). Para cada cruce se generó una curva de mortalidad. La ligación al sexo fue determinada comparando la pendiente y el intercepto de las regresiones de los cruces recíprocos y las colonias parentales. Se probó la hipótesis nula de que las líneas son paralelas e iguales usando POLO-PC (LeOra Software 1987; Robertson *et al.* 2007). La dominancia de resistencia se calculó usando el método de dominancia efectiva a una concentración fija (D_{ML}) descrito por Bourguet *et al.* (2000). Para estimar el número de locus que confieren resistencia a Cry1F, la progenie de la F_1 de los cruces recíprocos fueron retro cruzados con la colonia resistente. El poder de pruebas indirectas para modos de herencia es mayor cuando el retrocruce se origina de los cruces entre la progenie F_1 y la colonia parental con mayores diferencias en susceptibilidad (Roush & Daly 1990; Tabashnik 1991). Se probó el modelo de herencia monogénica usando una prueba de chi-cuadrado (Georghiou 1969; Preisler *et al.* 1990; Tabashnik 1991; Tabashnik *et al.* 1992). Como hipótesis se partió de la premisa de que si la resistencia es monogénica, el retrocruce producirá una progenie donde el 50% son RS y el 50% RR, y para probarla, se calculó la mortalidad esperada usando la formula descrita por Tabashnik (1991). Las diferencias obtenidas entre la mortalidad observada y esperada en cada concentración se compararon usando una prueba de chi-cuadrado (Tabashnik 1991).

Resistencia Cruzada. Para determinar si la resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* causa cambios en la susceptibilidad a otras toxinas *Bt*, se realizaron bioensayos de las colonias susceptible y resistente expuestas a las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry2Aa y Vip3Aa. Las concentraciones letales CL_{50} fueron calculados para Cry1Ab y Vip3Aa usando POLO-PC (LeOra Software, 1987). La concentración de inhibición de crecimiento del 50% de la población CI_{50} , se estimó para Cry1Ab, Cry1Ac y Vip3Aa usando PROC NLIN (Instituto SAS 2011). Adicionalmente, se calcularon las tasas de sensibilidad para estas toxinas. Tanto la colonia susceptible y resistente exhibieron una respuesta reducida a Cry1Aa, Cry1Ba y Cry2Aa, por lo tanto, la concentración mas alta posible fue usada para realizar bioensayos tomando el peso de las larvas individualmente (64 larvas por colonia). Los pesos de las larvas se transformaron a porcentaje de inhibición de crecimiento en relación al control. Para identificar diferencias de inhibición significativas entre las colonias susceptible y resistente se realizó un análisis de varianza de una vía usando PROC GLIMMIX (Instituto SAS 2011).

Frecuencia de Alelos Resistentes. Se realizó un análisis de la generación F_1 para identificar la frecuencia de alelos resistentes en poblaciones de campo de Florida y Texas, áreas en las cuales *S. frugiperda* hiberna. Un análisis F_1 implica cruzar individuos del campo de genotipo desconocido con individuos de una colonia resistente. La progenie es analizada usando bioensayos para permitir discriminación entre homocigotos resistentes (SS), homocigotos susceptibles (RR) y heterocigotos (SR) (Gould *et al.* 1997; Mahon *et al.* 2010). Para este propósito, se recolectaron poblaciones de estados inmaduros de *S. frugiperda* de Florida y Texas entre 2010 y 2011. Las larvas y huevos del campo se criaron en el laboratorio hasta alcanzar el estado de pupa. Se

determinó el sexo de las pupas bajo el esteromicroscopio. Al momento de la emergencia, un adulto del campo se depositó con uno o dos individuos del sexo opuesto de la colonia resistente en un recipiente para apareamiento. Los huevos de cada par fueron se colectaron diariamente y depositados a temperatura ambiente para permitir la emergencia de las larvas. Un mínimo de 48 neonatos por pareja fueron analizados con un bioensayo usando una concentración diagnóstico de Cry1F. La mortalidad esperada con la concentración diagnóstico es dependiente del genotipo de los individuos colectados en el campo, generando tres diferentes respuestas de mortalidad. En el primer caso, si el parental es homocigoto susceptible la progenie resultante deberá ser compuesta de heterocigotos los cuales presentan un fenotipo susceptible que resulta en una mortalidad del 100% a la concentración diagnóstico. En el segundo caso, si el parental del campo es heterocigoto, la progenie tendrá una proporción de 1:1 de heterocigotos y homocigotos resistentes, resultando en aproximadamente 50% de mortalidad a la concentración diagnóstico. En el tercer caso, si el parental es homocigoto resistente, toda la progenie será resistente y una supervivencia del 100% es esperada con la concentración diagnóstico (Figura 1) (Gould *et al.* 1997; Mahon *et al.* 2010). Las larvas de las familias que se identificaron como resistentes en la F_1 , se criaron hasta adultos y se aparearon entre ellos. La descendencia de estos cruces (segunda generación F_2) se analizó con los bioensayos diagnósticos para confirmar la presencia de alelos resistente (Gould *et al.* 1997).

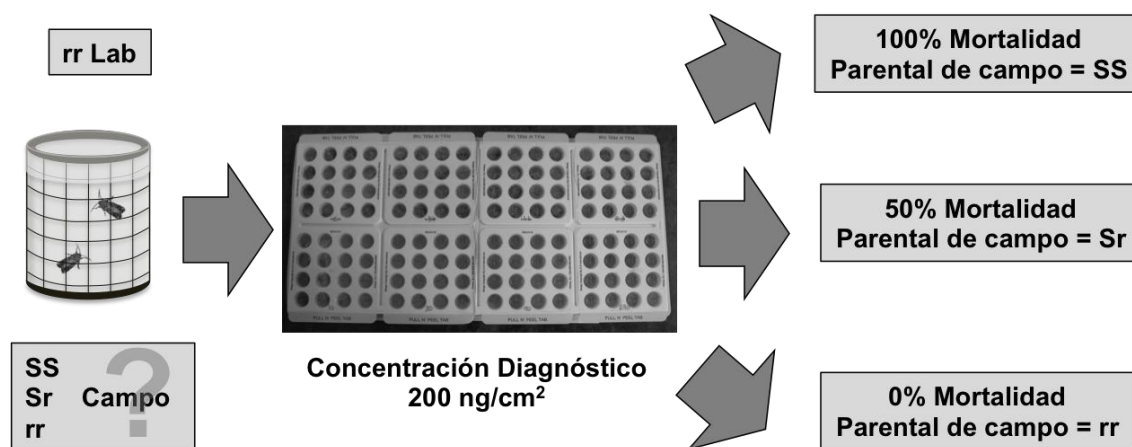


Figura 1. Esquema del experimento de segregación de alelos resistentes (r) de poblaciones de campo de Florida y Texas.

La información obtenida de los análisis F_1 se usó para estimar la frecuencia de los alelos resistentes, aplicando los métodos bayesianos descritos por Yue *et al.* (2008). Para calcular la probabilidad de un falso negativo se usó el método descrito por Wenes *et al.* (2006). Las diferencias en la frecuencia total de alelos resistentes entre Florida y Texas fue analizada usando el test exacto de Fisher.

Para analizar la prevalencia de los alelos resistentes en Puerto Rico, se colectaron huevos de *S. frugiperda* en Puerto Rico durante 2010, 2011, 2012 y 2013. Se permitió que los huevos eclosionaran y los neonatos se usaron para realizar bioensayos con la concentración diagnóstica. La frecuencia de alelos resistentes fue calculada usando la frecuencia de homocigotos de *Hardy-Weinberg* (Falconer & Mackay, 1996). La tasa de supervivencia y la frecuencia de alelos resistentes entre años se analizó con una prueba chi-cuadrado de homogeneidad.

Resultados y discusión

Niveles de Resistencia. Los bioensayos revelaron que la colonia resistente mostró un alto nivel de resistencia a Cry1F. La CL_{50} de la colonia susceptible fue 24.86 ng/cm² y para la colonia resistente mayor a 7,200 ng/cm², correspondiente a la concentración Cry1F más alta usada. Esta concentración fue utilizada para estimar la tasa de sensibilidad de la colonia resistente, indicando que presenta una resistencia 387 veces mayor a Cry1F purificada. La concentración diagnóstica calculada fue 200 ng/cm², la cual se usó para discriminar entre fenotipos susceptibles (SS y SR) y resistentes (RR).

Herencia de Resistencia. Los análisis de las curvas de mortalidad de los cruces recíprocos indicaron que la resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* es recesiva y autosomal (Figura 2A). La hipótesis de igualdad entre los cruces recíprocos indicaron que las pendientes y los interceptos son idénticos ($\chi^2 = 5.33$; $P > 0.05$), confirmando que la resistencia es autosomal (Robertson *et al.* 2007). La dominancia fue examinada comparando las curvas de mortalidad de la generación F_1 con la colonia parental más similar, en este caso la colonia susceptible. La prueba de igualdad mostró que no hay diferencias entre las pendientes y los interceptos ($\chi^2 = 9.02$; $P > 0.05$), indicando que la resistencia a Cry1F es recesiva. Adicionalmente, el método de dominancia efectiva (D_{ML}) generó un valor de cero, confirmando que la resistencia es recesiva.

La prueba del modelo de herencia monogénica versus poligénica se realizó comparando la respuesta de la progenie del retrocruce de la generación F_1 y la colonia resistente (SR x RR), con las colonias parentales (SS y RR). La curva de respuesta del retrocruce mostró que la curva se estabilizó al 50% de la mortalidad, sugiriendo una proporción 1:1 de genotipos heterocigotos (SR) y resistentes (RR) (Fig. 2B). Adicionalmente, la prueba de herencia monogénica descrita por Tabashnik (1991) mostró que cinco de los siete valores observados no se desviaron de los valores esperados, confirmando que la resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* es monogénica.

La resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* es similar a una colonia resistente de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) previamente seleccionada en laboratorio. La resistencia a Cry1F en este insecto es autosomal, recesiva y conferida por un solo locus (Pereira *et al.* 2007, 2008). Se ha sugerido que la frecuencia de los alelos resistentes a Cry1F en *O. nubilalis* en el medio oeste de los Estados Unidos podría ser más alta que la anticipada, sugiriendo que los alelos resistentes podrían haber estado presentes a frecuencias relativamente altas antes de la

introducción de plantas expresando Cry1F (Siegfried com. pers). Las altas frecuencias de los alelos resistentes a Cry1F en *O. nubilalis* y *S. frugiperda* sugieren que no existe un costo en el fitness asociado con alelos resistentes Pereira *et al.* (2009) reportaron que *O. nubilalis* resistente a Cry1F no presenta un costo en el fitness y resultados similares fueron encontrados para *S. frugiperda* (Vélez *et al.* sometido). La falta de costo en el fitness de individuos que poseen alelos resistentes, esta asociada con una tendencia de los alelos resistentes a permanecer estables en las poblaciones cuando no existe presión de selección, dificultando haciendo el desarrollo de estrategias de remediación de resistencia (Vélez *et al.* sometido).

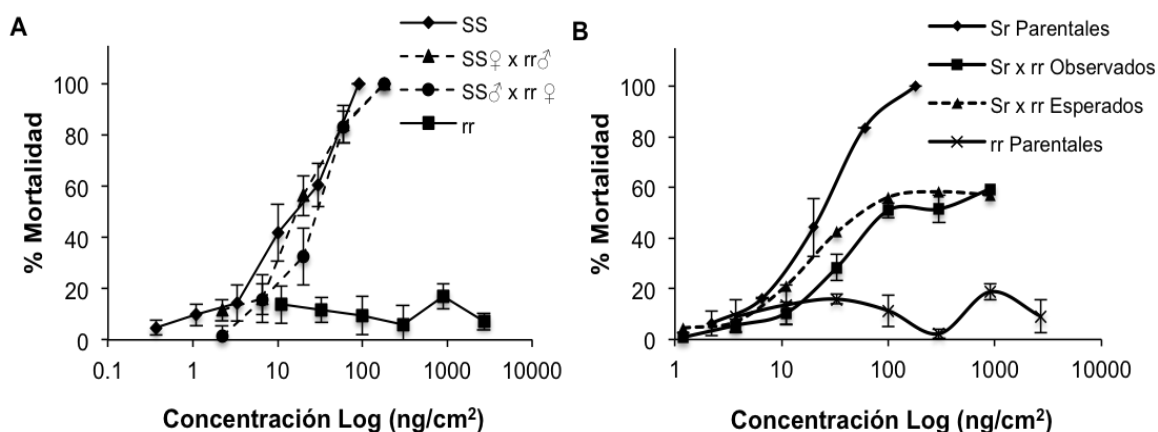


Figura 2. Curvas de mortalidad de *S. frugiperda* en respuesta a diferentes concentraciones de la proteína Cry1F (A) Curva de mortalidad de las colonia susceptible (SS), resistente (rr) y la progenie de los cruces recíprocos (SS x rr). (B) Curva de mortalidad de la F₁ (Sr), de la progenie de los retrocruces (Sr x rr), y de los parentales resistentes (rr). Las barras de error representan el error estándar de la media de la mortalidad a cada concentración.

Resistencia Cruzada. Las únicas proteínas Cry que generaron una respuesta en la colonia susceptible fueron Cry1Ab y Cry1Ac. La única toxina que generó mortalidad en la colonia susceptible fue Cry1Ab lo que permitió calcular la CL₅₀. La CL₅₀ para la colonia susceptible fue 37.46 ng/cm² y la dosis más alta usada en la colonia resistente fue 6000 ng/cm², generando una tasa de sensibilidad de mayor a 160.17 veces para mortalidad. La toxina Cry1Ac no generó mortalidad en la colonia susceptible, pero se observó inhibición de crecimiento. La CIC₅₀ para la colonia susceptible fue de 112.02 ng/cm² y para la colonia resistente correspondió a la dosis mas alta usada 15,000 ng/cm², generando una tasa de sensibilidad mayor a 133.9 veces para la inhibición de crecimiento. Los resultados de los bioensayos con Cry1Ab y Cry1Ac sugirieron que existe resistencia cruzada con Cry1Ab y Cry1Ac, aunque el nivel de resistencia es mucho más bajo que el observado para Cry1F. Estos resultados son importantes para asistir en la identificación del mecanismo de resistencia de Cry1F y para guiar decisiones de compatibilidad de toxinas para eventos expresando diferentes toxinas *Bt*. La resistencia cruzada de Cry1F con Cry1Ab y Cry1Ac

sugiere que la resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* podría ser generada por alteraciones de receptores del intestino medio. Estudios con otras especies de Lepidoptera sugieren que las proteínas Cry1A comparten los mismos receptores que Cry1F (Ferre & Van Rie, 2012; Hernández-Martínez *et al.*, 2009; Luo *et al.* 1999).

Los resultados de los bioensayos con Cry1Aa, Cry1Ba y Cry2Aa indicaron que *S. frugiperda* no es sensible a estas toxinas, aunque la inhibición de crecimiento fue observada a concentraciones altas. La prueba *t* indicó que no existen diferencias significativas entre la colonia susceptible y resistente para Cry1Aa ($t = -0.64$; $P = 0.52$) y Cry1Ba ($t = 0.16$; $P = 0.87$). Esto indica que no existe resistencia cruzada entre Cry1Aa, Cry1Ba y Cry1F. En contraste, la colonia resistente exhibió mayor inhibición de crecimiento con Cry2Aa ($t = -4.10$; $P < 0.0001$), sugiriendo un nivel bajo de resistencia negativa de esta toxina con Cry1F. La resistencia cruzada negativa corresponde a un aumento de susceptibilidad a Cry2Aa debido a la resistencia a Cry1F. Sin embargo, las diferencias encontradas fueron leves y la indicación de resistencia cruzada negativa entre Cry2Aa y Cry1F es incierta.

Los resultados de los bioensayos con Vip3Aa indicaron una CL_{50} de 25.77 ng/cm² para la colonia susceptible y de 34.38 ng/cm² para la colonia resistente. La hipótesis de igualdad para mortalidad entre la colonia resistente y la susceptible indicaron que los interceptos y pendientes son iguales ($\chi^2 = 5.5$; $P > 0.05$), sugiriendo que no existe resistencia cruzada entre Vip3Aa y Cry1F. Estos resultados soportan experimentos previos los cuales indican que Cry1F y Vip3Aa no comparten el mismo receptor (Sena *et al.* 2009). Por esta razón, la toxina Vip3Aa tiene un alto potencial para controlar poblaciones de *S. frugiperda* resistentes a Cry1F. De igual forma, esta toxina puede ser usada junto con Cry1F en eventos transgénicos expresando mas de una toxina *Bt*.

Frecuencia de Alelos Resistentes. La naturaleza de la herencia de Cry1F en *S. frugiperda*, autosomal, recesiva y conferida por un solo locus, permite el uso del análisis de la F_1 como una herramienta eficiente para detectar alelos resistentes en poblaciones de campo. Los alelos resistentes a Cry1F fueron encontrados con mayor frecuencia en la Florida que en Texas durante los dos años de evaluación (Tabla 1). En el 2010, cinco individuos heterocigotos fueron encontrados en *Palm Beach* Florida representando una frecuencia de alelos resistentes de 0.122. En el 2011 se encontraron seis individuos heterocigotos y tres homocigotos resistentes en *Palm Beach* Florida, resultando en una frecuencia de 0.2472. En *Hendry County* Florida se encontraron dos individuos heterocigotos resultando en una frecuencia de 0.0531. A pesar de que estas localidades se encuentran a aproximadamente de 113 kilómetros de distancia, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de alelos resistentes de estas poblaciones. Para Texas, no se encontraron alelos resistentes a Cry1F en 2010. Sin embargo, en 2011 un individuo homocigoto resistente fue encontrado en el condado de *Hidalgo* Texas, generando una frecuencia de alelos resistentes de 0.0247. En el condado de *Nueces* Texas se encontró un individuo heterocigoto, resultando en una frecuencia de 0.01056. El test de Fisher indico que existen diferencias en la frecuencia de alelos resistentes entre los dos estados ($P < 0.0001$). Se encontró que cuando la

mortalidad en el controles es del 10% y el número total de larvas de la F_1 es 30, la probabilidad de encontrar un falso negativo por cruce es de 1.6×10^{-8} lo cual sugiere una alta probabilidad de detección (Wenes *et al.* 2006). Los resultados de este test sugieren que los alelos resistentes detectados en Florida y Texas son los mismos alelos observados en Puerto Rico. Con base en estos resultados, la frecuencia de alelos resistente en Florida puede ser tan alta como del 13% y pueden existir diferencias entre poblaciones locales. Estos porcentaje son mas alto de lo esperado y por esta razón es importante continuar el monitoreo tanto de las frecuencias de alelos resistentes como de los reportes de daño a maíz Cry1F. Aunque la frecuencia de resistencia entre poblaciones de Texas fue mucho más baja (0.02), se detectó la presencia de alelos resistentes.

Los resultados de la frecuencia de alelos resistentes en Florida y Texas son consistentes con estudios de flujo genético basados en haplotipos mitocondriales, donde se sugiere que intercambio genético ocurre entre Puerto Rico y Florida pero el intercambio genético entre Florida y Texas es limitado (Nagoshi *et al.*, 2010; Nagoshi *et al.*, 2012). La migración de individuos resistentes de Puerto Rico, puede ser una de las razones de la frecuencia relativamente alta de alelos resistentes en el sur de la Florida. Aunque la selección local también podría estar afectando frecuencias de alelos resistentes. Adicionalmente, presiones de selección previas generadas por el uso de *Bt* foliares, y/o selección local con maíz Cry1F, podría haber afectado la frecuencia de los alelos resistentes. Desafortunadamente, es difícil determinar la cantidad de maíz Cry1F plantado en el sur de la Florida. Diferencias locales entre condados puede ser el resultado de diferencias en área plantadas de maíz Cry1F las cuales generan diferentes presiones de selección. Es necesario el desarrollo de estudios adicionales para concluir los factores que favorecen las diferencias en las frecuencias de alelos resistentes entre Florida y Texas, y a nivel local en la Florida.

Tabla 1. Frecuencia de los alelos resistentes Cry1F en poblaciones de *S. frugiperda* de Florida y Texas durante 2010 y 2011.

Año	Locación	Familias Evaluadas	Alelos Resistentes		$E[P_R]^a$ (95% IC)
			Sr	rr	
2010	Palm Beach, FL	24	5	0	0.1229 (0.0468 - 0.2035)
2011	Palm Beach, FL	28	6	3	0.2472 (0.1322 - 0.3053)
	Hendry, FL	27	2	0	0.0531 (0.0113 - 0.1175)
Total		79	13	3	0.1322 (0.0799 - 0.1729) ^b
2010	Lubbock, TX	20	0	0	0.0000
	Lubbock, TX	3	0	0	0.0000
	Hidalgo, TX	39	1	0	0.0247 (0.0031 - 0.0658)
2011	Hidalgo, TX	23	0	0	0.0000
	Nueces, TX	13	0	1	0.1056 (0.0233 - 0.2141)
Total		99	1	1	0.0200 (0.0055 - 0.0426) ^b

^a Frecuencia de alelos resistentes. ^b Frecuencia de alelos resistentes $E[P_R]$ en Florida significativamente diferente a Texas (Test exacto de Fisher, $P < 0.0001$).

Los bioensayos realizados con los neonatos colectados en maíz de Puerto Rico en 2010, 2011, 2012 y 2013 indicaron que la proporción de supervivencia y la frecuencia de alelos resistentes cambió entre años ($\chi^2 = 44.92$; $P < 0.0001$) (Tabla 2). Sin embargo, a pesar de la fluctuación entre años, los niveles de resistencia se mantuvieron altos y constantes, con una baja frecuencia de los alelos susceptibles. Estos resultados pueden no reflejar todas las poblaciones de *S. frugiperda* en Puerto Rico. Estudios previos en dos diferentes localidades en Puerto Rico, Santa Isabel y Lajas, sugieren la ausencia de alelos susceptibles a Cry1F (Storer *et al.* 2012).

Tabla 2. Frecuencias de los alelos resistentes Cry1F en poblaciones de *S. frugiperda* de Juana Díaz Puerto Rico durante 2010, 2011, 2012 y 2013.

Año	Número de Insectos Analizados	Supervivencia	Frecuencia de Alelos Resistentes ^a
2010	48	35	0.854
2011	224	182	0.901
2012	1118	808	0.85
2013	671	574	0.925

^a Frecuencia de alelos resistentes calculados usando la frecuencia de homocigotos de Hardy-Weinberg ($q^2 = \sqrt{q}$). La proporción de supervivencia y frecuencia de alelos resistentes cambió significativamente entre años (χ^2 para homogeneidad = 44.92, $P < 0.0001$).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo sugieren que existe un riesgo de evolución de resistencia a maíz Cry1F en poblaciones de *S. frugiperda* fuera de Puerto Rico. Sin embargo, debido a que la resistencia es recesiva su evolución se puede retrasar con el uso adecuado de los refugios requeridos para el manejo integrado de resistencia (Gould 1998). Actualmente en el sur de Estados Unidos se requiere de un 50% de refugio para el uso de maíz transgénico. El uso de esta estrategia junto con plantas que expresan toxinas con diferentes modos de acción efectivos para el manejo de *S. frugiperda* puede ayudar a reducir la propagación de los alelos resistentes (Adamczyk y Mahaffey 2008; Storer *et al.* 2012). Hasta la fecha, no existen reportes de efectividad reducida a maíz Cry1F en Florida o Texas (Tabashnik *et al.* 2009; Hardke *et al.* 2011; Storer *et al.* 2012). No obstante, la implementación de programas de monitoreo de resistencia, junto con el seguimiento de daño a maíz Cry1F debe ser una prioridad. Si la reducción en eficacia de este producto esta ligada a cambios en la frecuencia de alelos resistentes, sería necesario tomar acciones para limitar la supervivencia y dispersión de individuos portadores del alelo resistente (Siegfried *et al.* 2007). Adicionalmente, Storer *et al.* (2012) sugiere el uso de insecticidas sintéticos cuando las poblaciones de *S. frugiperda* son altas para ayudar a reducir la frecuencia de alelos resistentes.

Estudios adicionales sobre la biología de *S. frugiperda* resistente a Cry1F (comportamiento y migración) ayudarán a generar un mejor entendimiento de la evolución de resistencia a Cry1F en *S. frugiperda* en Puerto Rico. El entendimiento de la evolución de resistencia en *S. frugiperda* proporcionará bases para la predicción de problemas futuros con este insecto y asistirá en el desarrollo de mejores estrategias de manejo de resistencia de actuales y futuros cultivos transgénicos *Bt*. La información adquirida de *S. frugiperda* resistente a Cry1F de Puerto Rico guiará estrategias de manejo de resistencia en Latino América donde este insecto es una plaga importante de maíz y algodón. Es importante tener en cuenta que el uso creciente de cultivos *Bt* en Latino América sugiere la necesidad de generar programas de manejo de resistencia diseñados para áreas tropicales donde la producción de cultivos y la presión de selección es continua.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Carolina Camargo, Rita Isabel Vélez y la Dra. Paula Sepúlveda por su asistencia con el manuscrito. Los autores agradecen a Dupont Pioneer por proporcionar la colonia resistente de *S. frugiperda* de Puerto Rico y la toxina Cry1F usada en los bioensayos. A Syngenta por proporcionar la toxina Vip3Aa. A Dr. Pat Porter, Dr. Noel Troxclair and Monti Vandiver de Texas AgriLife Research and Extension por las colecciones de *S. frugiperda* de Texas en 2010. A Taurino Trujillo, Jorge Guzman y Dr. Marlin Rice de Dupont Pioneer por asistir con colecciones de *S. frugiperda* en Texas en 2011.

Literatura Citada

- ADAMCZYK, J. J.; MAHAFFEY, J. S. 2008. Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various Lepidopteran pests. *Florida Entomologist* 91: 570-574.
- BOURGUET, D., GENISSEL, A.; RAYMOND, M. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *Journal of Economic Entomology* 93: 1588-1595.
- BUNTIN, G. D. 2008. Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. *Florida Entomologist* 91: 523-530.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. 1996. Introduction to quantitative genetics. Fourth Edition. Pearson, Prentice Hall.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47: 501-533.
- FINNEY, D. J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- GEORGHIOU, G. P. 1969. Parasitological review: genetics of resistance to insecticide in houseflies and mosquitoes. *Experimental Parasitology* 26: 224-255.
- GOULD, F., ANDERSON, A., JONES, A., SUMMERFORD, D. HECKEL; D. G., LOPEZ, J., MICINSKI, S., LEONARD, R.; LASTER, M. 1997 Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Science* 94: 3519-3523.

- GOULD, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology* 43: 701-726.
- HARDKE, J. T., LEONARD, B. R. HUANG, F.; JACKSON, R. E. 2011. Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. *Crop Protection* 30: 168-172.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. 2009. Broad spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein. *Pest Management Science* 65: 645-650.
- JAMES, C. 2009. Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2008. ISAAA Brief No. 39. International Service for the Acquisition of Ag-biotech Applications, Ithaca, NY.
- LEORA SOFTWARE. 1987. POLO-PC: A user's Guide to Probit and Logit Analysis, Berkeley, CA.
- LUO, K., BANKS, D.; ADANG, M. J. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Applied Environmental Microbiology* 65: 457-464.
- MARÇON, P. C. R. G., SIEGFRIED, B. D., SPENCER, T.; HUTCHISON, W. D. 2000. Development of diagnostic concentrations for monitoring *Bacillus thuringiensis* resistance in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 925-930.
- MAHON, R. J., DOWNES, S., JAMES, W.; PARKER, T. 2010. Why do F₁ screens estimate higher frequencies of Cry2Ab resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) than do F₂ screens? *Journal of Economic Entomology* 103: 472-481.
- MATTEN, S.R, HEAD, G. P.; QUEMADA, H. D. 2008. How governmental regulation can help or hinder the integration of *Bt* crops into IPM programs pp. 27-39 in Romeis, J., Shelton, A. M. & Kennedy, G. G. S. (Eds.) *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. Springer, New York.
- MCKENZIE, J. A. 1996. Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. R. G. lands Company and Academic, Austin, TX.
- MITCHELL, E. R, MCNEIL, J. N., WESTBROOK, J. K., SILVAIN, J. F., LALANNE-CASSOU, B., CHALFANT, R. B., PAIR, S. D., WADDILL, V. H., SOTOMAYOR-RIOS, A.; PROSHOLD, F. I. 1991. Seasonal periodicity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the Caribbean Basin and northward to Canada. *Journal of Entomological Science* 26: 39-50.
- NAGOSHI, R. N., MEAGHER, R. L.; JENKINS, D. A. 2010. Puerto Rico Fall Armyworm has only limited interactions with those from Brazil or Texas but could have substantial exchanges with Florida populations. *Journal of Economic Entomology* 103: 360-367.
- NAGOSHI, R. N., MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M. 2012. Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes. *Ecology and Evolution* 2: 1458-1467.
- PEREIRA, E. J. G., LANG, B. A., STORER, N. P. & SIEGFRIED B. D. 2007. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. *Entomology Experimentalis et Applicata* 126: 115-121.
- PEREIRA, E. J. G., STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. 2008. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. *Bulletin of Entomological Research* 98: 621-629.
- PEREIRA, E. J. G., STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. 2009. Fitness costs of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Applied Entomology* 132: 1-8.

- PERKINS, W.D. 1979. Laboratory rearing of the fall armyworm. *Florida Entomologist* 62: 87-90.
- PREISLER, H. K., HOY, M. A.; ROBERTSON, J. L. 1990. Statistical analysis of modes of inheritance for pesticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 83: 1649-1655.
- ROBERTSON, J. L., PREISLER, H. K., NG, S. S., HICKLE, L. A.; GELERTER, W. D. 1995. Natural variation – a complication factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *Journal of Economic Entomology* 88: 1-10.
- ROBERTSON, J. L., RUSSEL, R. M., PREISLER, H. K.; SAVIN, N. E. 2007. *Bioassays with Arthropods*. Second Edition. CRC Press.
- ROUSH, R. T.; DALY, J. C. 1990. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97-152 in: Roush, R.T. & Tabashnik, B. E. (Eds.) *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall, New York.
- SAS INSTITUTE. 2011. *SAS user's manual*, version 9.3. SAS Institute, Cary NC.
- SENA, J. D. A., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied Environmental Microbiology* 75: 2236-2237.
- SHELTON, A. M., ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47: 845-881.
- SIEBERT, M., BABOCK, J. M., NOLTING, S., SANTOS, A. C., ADAMCZYK, J. J., NEESE, P. A., KING, J. E., JENKINS, J. N., MCCARTY, J., LORENZ, G. M., FROMME, D. D.; LASSITER, R. B. 2008. Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomology* 91: 555-565.
- SIEGFRIED, B. D., SPENCER, T., CRESPO, A. L., STORER, N. P., HEAD, G. P., OWENS, E. D.; GUYER, D. 2007. Ten years of *Bt* resistance monitoring in the European corn borer. *American Entomologist* 53: 208-214.
- SPARKS, A. N. 1979. A review of the biology of the fall armyworm. *Florida Entomologist* 62: 82-87.
- STORER, N. P., BABCOCK, J. M., SCHLENZ, M., MEADE, T., THOMPSON, G. D. BING, J. W.; HUCKABA, R. M. 2010. Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology* 103: 1031-1038.
- STORER, N.P., KUBISZAK, M.E., KING, E., THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C. 2012. Status of resistance to *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 294-300.
- TABASHNIK, B. E. 1991. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. *Journal of Economic Entomology* 84: 703-712.
- TABASHNIK, B. E., SCHWARTZ, J. M., FINSON, N.; JOHNSON, M. W. 1992. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* 85: 1046-1055.
- TABASHNIK, B. E., VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIÈRE, Y. 2009. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology* 102: 211-2025.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2001. *Insect Resistance Management*, in *Biopesticides Registration Action Document-Bacillus thuringiensis Plant-Incorporated Protectants*. http://www.epa.gov/opppbd1/biopesticides/pips/bt_brad2/4-irm.pdf
- VAN RIE, J. 1991. Insect control with transgenic plants: resistance proof? *Trends in Biotechnology* 9: 177-179.

- WENES, A. L., BOURGUET, D., ANDOW, D. A., COURTIN, C., CARRÉ, G., LORME, P., SANCHEZ, L.; AGUSTIN, S. 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* 97: 127-134.
- YUE, B., HUANG, F., LEONARD, B. R., MOORE, S., PARKER, R., ANDOW, D. A., COOK, D., EMFINGER, K.; LEE, D. R. 2008. Verifying an F₁ screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomology Experimentalis et Applicata* 129: 172-180.